

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑪ DE 37 43 136 A1

⑳ Aktenzeichen: P 37 43 136.6
㉑ Anmeldetag: 18. 12. 87
㉒ Offenlegungstag: 1. 9. 88

⑤1 Int. Cl. 4:
C12N 11/14
C 12 N 11/08
C 12 N 11/10
C 12 N 11/12
// (C08J 5/12,
C08L 1:00)C08L 3:00,
5:00,25:04,29:04,
29:10,33:00,39:04,
65:00,67:02,69:00,
71:04,77:10,81:04,
83:04

DE 37 43 136 A1

③0 Innere Priorität: ③2 ③3 ③1
17.02.87 DE 37 04 892.9

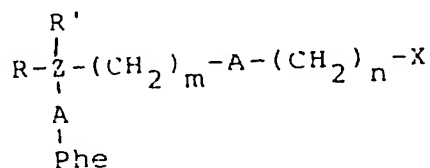
⑦1 Anmelder:
Siegel, Rolf, Dr., 8700 Würzburg, DE

⑦4 Vertreter:
von Föner, A., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Ebbinghaus,
D., Dipl.-Ing.; Finck, K., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.,
Pat.-Anwälte, 8000 München

⑦2 Erfinder:
gleich Anmelder

⑤4 Zell- und Gewebekultursubstrate zur in vitro Kultivierung von eukaryontischen Zellen

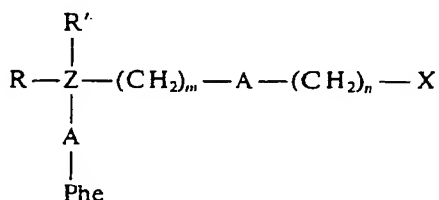
Gegenstand der Erfindung sind Zell- und Gewebekultursubstrate zur in vitro Kultivierung von eukaryontischen Zellen, bestehend aus synthetischen Materialien, insbesondere solchen, die aus mindestens einem aromatischen Monomeren synthetisiert worden sind, wie Polystyrol, Copolymerisate von Polystyrol, Polycarbonate, Polyalkylenterephthalate Polyvinylcarbazol, Polyphenylenoxid, Polysulfon, Polyethersulfon, Polyarylimid, Polybenzimidazol, Polybenzoxacindion, Polyphenylen, Polyphenylensulfid, Poly-p-Xylylen, poly(p-Phenylene)-Terephthalamid oder aryl-, insbesondere phenyl-, phenylene-, benzal-, benzyl-, phenylsilyl-, benzalsilyl-, benzylsilyl-, diphenylmethyl-, diphenylsilyl-, triphenyl-, triphenylmethyl- oder triphenylsilyl-derivatisierten makromolekularen Verbindungen, bevorzugt aus der Stoffklasse der Polysaccharide, wie Stärke, Amylopectin, Agar-Agar, Agarose, Dextran, Cellulose (Sägestaub, Baumwoll-Linters) oder aus der Stoffklasse der wasserlöslichen Kunststoffe, wie Polyvinylalkohol, Polyvinylether, Polyvinylester, Acrylpolymerisate oder aus der Stoffklasse der Siliziumverbindungen, wie Silicone, Glas, Quarzglas, Bentonit, Kieselgur oder Blähton, insbesondere wenn die synthetischen Materialien oder die arylderivatisierten makromolekularen Verbindungen in Form von Folien, Kügelchen, Fasern, Roux bottles, Klonierungsplatten, roller bottles, Röhrchen oder anderer für Zell- und Gewebekulturzwecke geeigneten Ausbildungen vorliegen und so in bekannter Art und ...



DE 37 43 136 A1

Patentansprüche

1. Zell- und Gewebekultursubstrate zur in vitro Kultivierung von eukaryontischen Zellen, bestehend aus synthetischen Materialien, insbesondere solchen, die aus mindestens einem aromatischen Monomeren synthetisiert worden sind, wie Polystyrol, Copolymerisate von Polystyrol, Polycarbonate, Polyalkylenterephthalate, Polyvinylcarbazol, Polyphenylenoxid, Polysulfon, Polyethersulfon, Polyarylimid, Polybenzimidazol, Polybenzoxacindion, Polyphenylen, Polyphenylensulfid, Poly-p-Xylilyen, Poly(p-Phenylen-)Terephthalamid oder aryl-, insbesondere phenyl-, phenylen-, benzal-, benzyl-, phenylsilyl-, benzalsilyl-, benzylsilyl-, diphenylmethyl-, diphenylsilyl-, triphenyl-, triphenylmethyl- oder triphenylsilylderivatisierten makromolekularen Verbindungen, bevorzugt aus der Stoffklasse der Polysaccharide, wie Stärke, Amylopectin, Agar-Agar, Agarose, Dextran, Cellulose (Sägestaub, Baumwoll-Linters) oder aus der Stoffklasse der wasserlöslichen Kunststoffe, wie Polyvinylalkohol, Polyvinylether, Polyvinylester, Acrylpolymerisate oder aus der Stoffklasse der Siliziumverbindungen, wie Silicone, Glas, Quarzglas, Bentonit, Kieselgur oder Blähton, insbesondere wenn die synthetischen Materialien oder die arylderivatisierten makromolekularen Verbindungen in Form von Folien, Kügelchen, Fasern, Roux bottles, Klonierungsplatten, roller bottles, Röhrchen oder anderer für Zell- und Gewebekulturzwecke geeigneten Ausbildungen vorliegen und so in bekannten Art und Weise eingesetzt werden, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine oder mehrere Verbindungen der allgemeinen Formel



wobei Z: P, N, S, O, Si oder C ist;

wobei A: Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (—S—S—), Methylen (—CH—) oder —NH— sein kann;

wobei: *m* und *n* gleich oder unterschiedlich sind und 0 bis 10 vorzugsweise 1 bis 5 sind;

wobei: Phe ein gegebenenfalls aryl-, alkyl-, alkenyl-, alkinyl-, carboxy-, carbamin-, halogen-, nitro-, hydroxi-, amino-, oxo-, acyl- oder cycloalkylsubstituierter aromatischer Rest;

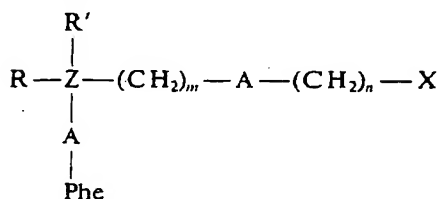
wobei: R ein gegebenenfalls aryl-, carboxy-, carbamin-, halogen-, nitro-, hydroxi-, amino-, oxo-, acyl- oder cycloalkylsubstituierter Alkyl-, Alkenyl-, Alkinylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, Phe oder Wasserstoff ist;

wobei R': Sauerstoff, Schwefel, R oder unterschiedlich R ist;

wobei X: Wasserstoff, eine Sulfon-, Sulfat-, Phosphatgruppe, quaternäre Ammoniumgruppe, amid- oder glykosidisch gebundene Zuckergruppe, sulfat- oder phosphatester-gebundene aminierte, phosphorilierte oder acetylierte Zuckergruppe ist;

an die Oberflächen der synthetischen Materialien oder an die arylderivatisierten makromolekularen Verbindungen adsorbiert ist bzw. sind.

2. Verfahren zur Herstellung von Zell- und Gewebekultursubstraten zur in vitro Kultivierung von eukaryontischen Zellen auf Oberflächen, dadurch gekennzeichnet, daß man synthetische Materialien oder arylderivatisierte makromolekulare Verbindungen mit einer Lösung in innigen Kontakt bringt, in der eine oder mehrere Verbindungen der allgemeinen Formel



wobei Z: P, N, S, O, Si oder C ist;

wobei A: Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (—S—S—), Methylen (—CH—) oder —NH— sein kann;

wobei: *m* und *n* gleich oder unterschiedlich sind und 0 bis 10 vorzugsweise 1 bis 5 sind;

wobei: Phe ein gegebenenfalls aryl-, alkyl-, alkenyl-, alkinyl-, carboxy-, carbamin-, halogen-, nitro-, hydroxi-, amino-, oxo-, acyl- oder cycloalkylsubstituierter aromatischer Rest;

wobei: R ein gegebenenfalls aryl-, carboxy-, carbamin-, halogen-, nitro-, hydroxi-, amino-, oxo-, acyl- oder cycloalkylsubstituierter Alkyl-, Alkenyl-, Alkinylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, Phe oder Wasserstoff ist;

wobei R': Sauerstoff, Schwefel, R oder unterschiedlich R ist;

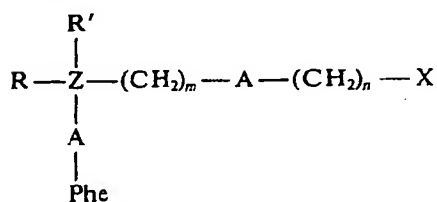
wobei X: Wasserstoff, eine Sulfon-, Sulfat-, Phosphatgruppe, quaternäre Ammoniumgruppe, amid- oder glykosidisch gebundene Zuckergruppe, sulfat- oder phosphatester-gebundene aminierte, phosphorilierte oder acetylierte Zuckergruppe ist;

gelöst sind und anschließend das Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch wieder vollständig entfernt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als synthetische Materialien oder arylderi-

vatisierte makromolekulare Verbindungen solche einsetzt, die in Form von Folien, Kügelchen, Fasern, Roux bottles, Klonierungsplatten, roller bottles, Röhrchen oder anderer für Zell- und Gewebekulturzwecke geeigneten Ausbildungen vorliegen.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als synthetische Materialien, Materialien einsetzt, die aus mindestens einem aromatischen Monomeren synthetisiert worden sind. 5
5. Verfahren nach Anspruch 2 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß man als Materialien, die aus mindestens einem aromatischen Monomeren synthetisiert worden sind, Polystyrol, Copolymerisate des Polystyrol, Polycarbonate, Polyalkylenterephthalate, Polyvinylcarbazol, Polyphenylenoxid, Polysulfon, Polyethersulfon, Polyarylimid, Polybenzimidazol, Polybenzoxacindion, Polyphenylen, Polyphenylensulfid, Poly-p-Xylylen, poly(p-Phenyl-)Terephthalamid oder ähnliche Materialien einsetzt. 10
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man als Polyalkylenterephthalat Polyethylen-terephthalat (PET) (Mylar (R)) einsetzt.
7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man als Copolymerisate des Polystyrols Divinylbenzol-vernetztes Polystyrol (DVB crosslinked polystyrene) einsetzt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man als Divinylbenzol-vernetztes Polystyrol XAD-4(R), XAD-2(R), Biobeads (R) SX-2, Amberchrom (R) AD-161 oder ähnliches einsetzt. 15
9. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man als ein Polycarbonat Makrofol (R) einsetzt.
10. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man als poly(p-Phenyl-)Terephthalamid Kevlar (R) einsetzt.
11. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als arylderivatisierte makromolekulare Verbindungen phenyl-, phenylen-, benzal-, benzyl-, phenylsilyl-, benzalsilyl-, benzylsilyl-, triphenylmethyl-, triphenylsilyl-, diphenylmethyl-, oder diphenylsilyl-derivatisierte Polysaccharide bzw. wasserlösliche Kunststoffe bzw. Siliziumverbindungen einsetzt. 20
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die phenyl-, phenylen-, benzal-, benzyl-, phenylsilyl-, benzalsilyl-, benzylsilyl-, triphenylmethyl-, triphenylsilyl-, diphenylmethyl- oder diphenylsilyl-derivatisierten Polysaccharide bzw. wasserlöslichen Kunststoffe bzw. Siliziumverbindungen mit Wasser deutlich schlechter benetzbar bzw. in Wasser schlechter suspendierbar sind als die underivatisierten Ausgangsverbindungen. 25
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß, wenn man stöchiometrische Umsetzungsbedingungen zugrundelegt, die Polysaccharide bzw. wasserlöslichen Kunststoffe bzw. Siliziumverbindungen zu mindestens 10%, höchstens zu 100% phenyl-, phenylen-, benzal-, benzyl-, phenylsilyl-, benzalsilyl-, benzylsilyl-, triphenylmethyl-, triphenylsilyl-, diphenylmethyl- oder diphenylsilyl-derivatisiert sind. 30
14. Verfahren nach Anspruch 2, 12 und 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Polysaccharide und wasserlöslichen Polymere zwischen 40 und 90% arylderivatisiert sind.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man als diphenylsilyl-derivatisierte Siliziumverbindung mit Diphenyldichlorsilan umgesetzte Glaskügelchen einsetzt. 35
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man als phenylderivatisierte Siliziumverbindung eine Folie aus poly(Dimethyl-Diphenyl-)Siloxan einsetzt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man als benzylderivatisiertes Polysaccharid mit Benzylchlorid umgesetzte Agarose, speziell Agarosekügelchen ("beads") einsetzt. 40
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man als triphenylsilyl-derivatisiertes Polysaccharid mit Phenyltrichlorsilan umgesetztes Cellophan (R) — Folie oder Dialysemembran aus Cellulose einsetzt.
19. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man als phenylderivatisierten wasserlöslichen Kunststoff mit Phenylchlorformiat umgesetzten Polyvinylalkohol 49 000 einsetzt. 45
20. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als Verbindungen der allgemeinen Formel



Phenyl-, Phenoxy-, Thiophenyl-, Benzal-, Benzyl-, Phenylsilyl-, Benzalsilyl-, Benzylsilyl-, Diphenylmethyl-, Diphenylsilyl-, Triphenyl-, Triphenylmethyl- oder Triphenylsilylverbindungen einsetzt. 50

21. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß, wenn man synthetische Materialien bzw. diphenylmethyl-, triphenylmethyl-, diphenylsilyl- oder triphenylsilyl-derivatisierte makromolekulare Verbindungen verwendet, man eine Lösung einsetzt, in der Phenyl-, Phenoxy-, Thiophenyl-, Benzal-, Benzyl-, Diphenyl- oder Triphenylverbindungen gemäß der allgemeinen Formel gelöst sind. 60
22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß, wenn man diphenylsilyl- oder triphenylsilyl-derivatisierte Siliziumverbindungen verwendet, man eine Lösung einsetzt, in der Diphenylsilyl-, Triphenylsilyl-, Phenyl-, Phenoxy-, Thiophenol-, Benzal-, Benzyl-, Phenylsilyl-, Benzalsilyl-, Benzylsilylverbindungen gemäß der allgemeinen Formel gelöst sind. 65
23. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß, wenn man phenyl-, phenylen-, benzal-, benzyl-, phenylsilyl-, benzalsilyl- oder benzylsilyl-derivatisierte makromolekulare Verbindungen verwendet,

man eine Lösung einsetzt, in der Phenyl-, Phenoxy-, Thiophenyl-, Benzal-, Benzyl-, Phenylsilyl-, Benzalsilyl-, Benzylsilylverbindungen gemäß der allgemeinen Formel gelöst sind.

24. Verfahren nach Anspruch 2 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß man als Phenyl-, Phenoxy-, Thiophenyl-, Benzal-, Benzyl-, Phenylsilyl-, Benzalsilyl- oder Benzylsilylverbindung Phenol, Anilin, 2-Phenyl-ethylalkohol, 1-Phenylethylamin, 2-Phenylethylamin, Phenylethylenglykol, 1-Phenylethanol, 2-Anilinoethanol, 2-Phenylethanthiol, Phenylalanin, Tryptophan, Phenylbernsteinsäure, Benzoesäure, Biphenyl-4-methanol, Phenylborsäure, Phenyl-brenztraubensäure, 4-Phenyl-buttersäure, N-Phenylharnstoff, 4-Phenyl-2-butylamin, 4-Amino-phenylessigsäure, Aminophenol, N-Phenyl-diethanolamin, Phenylendiamin, Benzodimethanol, Phenyl- β -D-galactopyranosid, Phenyl- β -D-glucopyranosid, N-Phenylglycin, Phenylglycinol, Phenylglyoxylsäure, Phenylhydrazin(hydrochlorid), Phenylharnstoff, O-Phenyl-hydroxylamin-hydrochlorid, Phenylmalonsäure, Thiophenol, Phenylmercaptoessigsäure, Aminodiphenylether, 3-Amino-2,3-dihydro-benzoesäure-hydrochlorid, 4-Phenyl-cyclohexanon, N-Phenyldiethanolamin, Phenyldichlorphosphat, Phenyl-dichlorphosphin, Phenyl-dimethylchlorsilan, Phenylessigsäure, Phenylessigsäurechlorid, Phenyl-formamid, Phenylmethansulfonylchlorid, Phenyl-milchsäure, Phenylphosphinsäure, Phenylphosphonsäure, Phenyl-dichlorphosphat, 1-2-Phenoxy-glycin, 2-Phenoxy-alanin, 2-Phenoxy-essigsäure, 2-Phenoxy-essigsäureamid, Phenyl-piperazin, 4-Benzyl-piperidin, Phenylpropanolamin, Phenylpropionsäure, 2-Phenyl-propionaldehyd, Phenyl-propylalkohol, Phenyl-propylamin, Phenyl-propylbromid, Phenidol, Phenyl-salicylat, 1-Phenyl-semicarbazid, Phenyl-dimethylsilanol, Phenyl-dimethylsilylamin, Schwefelsäure-phenylester, Phosphorsäure-phenylester, Kresole, Nitrophenole, Aminophenole, Phenyltrimethylammoniumchlorid, Brenzcatechin, Resorcin, Pyrimidine, 2-Phenoxy-ethanol, 4-Amino-diphenylether, 3-Phenoxy-benzaldehyd, 4-Phenoxy-buttersäure, 4-Phenoxy-phenol, 3-Phenoxytoluol, Phenylacetaldehyd, 2,2-Dimethoxyethylbenzol, Hydrochinon, Pyrogallol, Phloroglucin, Eugenol, Isoeugenol, Anethol, Vanillin, Thymol, Safrol, Saccharin, aromatische Sulfonsäuren, Benzosulfonsäure, Phthalimid oder ähnliche Verbindungen, sowie die Umsetzungsprodukte von Benzoesäureanhydrid, Benzoylchlorid, 3-Benzoyl-propionsäure, Benzylbromid, Benzylchlorid, Benzylchlorformiat, 4-Chlor-benzylalkohol, 9-Chlor-9-phenyl-xanthen, 1,3-Dimethyl-1,1,3,3-tetra-phenyldisilazan, 2,4-Dinitro-benzolsulfonylchlorid, Diphenylmethylchlorsilan, 1,3-Diphenyl-1,1,3,3-tetramethyl-disilazan, 4-Methoxybenzylalkohol, 1-Naphthylisocyanat, 2-Naphthylmercaptan, Neokupferron, 4-Nitro-benzoylchlorid, 4-Nitrophenyl-chlorformiat, Phenylchlorformiat, 2,2,2-Trichlorethyl-chlorformiat, Phenyl-dimethylchlorsilan, Phenylisocyanat, Toluol-3,4-dithiol, Tosylchlorid, Toluol-4-sulfonamid, Tosylhydrazid, Trimethylsilyl-benzolsulfonat, 2-Trimethylsilylethyl-p-nitrophenylcarbonat, Phenylisothiocyanat, Triphenylbromsilan, Benzylhalogenide, Phenylhalogenide und anderen reaktiven, aromatischen Verbindungen mit aminierte, phosphorierte und/oder acetylierte Zuckern oder Peptiden oder Proteinen.

25. Verfahren nach Anspruch 2 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß man als Diphenylmethyl- oder Diphenylsilylverbindungen Schwefelsäure-diphenylsilanester, Phosphorsäure-diphenylsilanester, Diphenyldiaminsilan, Diphenyldialkoxysilan, Diphenyldihydroxysilan, O-(Diphenylsilyl)dihydroxylamin, Diphenylsilyl-dimethoxysulfat, Diphenylsilyl-diethanol, Diphenylsilyl-dipropylamin oder ähnliche Verbindungen, sowie die Umsetzungsprodukte von tert.-Butyldiphenylchlorsilan, Diphenylmethylchlorsilan, 1,3-Diphenyl-1,1,3,3-tetramethyldisilazan, 1-Naphthylisocyanat, 2-Naphthylmercaptan und anderen reaktiven aromatischen Verbindungen mit aminierte, phosphorierte und/oder acetylierte Zuckern oder Peptiden oder Proteinen.

26. Verfahren nach Anspruch 2 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß man als Triphenyl-, Triphenylmethyl- oder Triphenylsilylverbindungen Triphenylamin, Triphenylphosphat, Triphenylphosphinoxid, Triphenylphosphinsulfid, Triphenylphenylphosphin-dibromid, Triphenylzinchlorid, O-Trityl-hydroxylamin, Triphenylmethan, Triphenylmethanol, Triphenylmethanthiol, Triphenylsilan, Triphenylsilanol, Triphenylsilylamin, O-Triphenylsilyl-hydroxylamin, Triphenylsilylphosphat, N-Triphenylsilyl-glucosamin, O-(Triphenylsilyl)-ethoxylamin, O-(Triphenylsilyl)-propyl-1- β -galactopyranosid, O-Triphenylsilylglucosamin, O-Triphenylsilyl-neuraminsäure, Triphenylsilyl- β -D,L-galactopyranosid, Triphenylsilyl- β -D,L-glucopyranosid, Triphenyl- β -D,L-mannopyranosid, Triphenyl-silylsulfat (Na-, K- oder Li-Salz), Ester zwischen aminierte, phosphorierte und/oder acetylierte Zuckern mit Triphenylsilylsulfat oder -phosphat, Etherverbindungen aus Triphenylchlorsilan oder Triphenylbromsilan und phosphorierte, aminierte und/oder acetylierte Zuckern, Triphenylsilylethylamin, Triphenylsilylessigsäure, Triphenylsilyl-buttersäureamid, Triphenylsilylglycerin, Triphenylsilyl-ethylenglykol, Triphenylsilylpolypropylenglykol, Triphenyl-silylsilanol, Triphenylsilylpropylsulfat (Na, K- oder Li-Salz) oder ähnliche Triphenylsilylverbindungen, sowie die Umsetzungsprodukte von Bromtriphenylmethan, Chlortriphenylmethan, 4,4'-Dimethoxytritylchlorid, Dimethyltritylbromsilan, 4-Methoxytrityl-chlorid, Neokupferron, 2-Triphenylphosphinoethyl-chlorformiatchlorid, Triphenylsilyl-benzolsulfonat, Triphenylbrommethan, Triphenylchlormethan, Triphenylchlorsilan, Tripyridinium-tetrafluoroborat, Triphenylbromsilan und anderen reaktiven aromatischen Verbindungen mit aminierte, phosphorierte und/oder acetylierte Zuckern oder Peptiden oder Proteinen.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Zell- und Gewebekultursubstrate zur in vitro Kultivierung von eukaryontischen Zellen gemäß dem Oberbegriff des Patentanspruchs 1.

Die in vitro Kultivierung von pflanzlichen und tierischen eukaryontischen Zellen in Form von Zell- und Gewebekulturen ist bekannt. Siehe hierzu beispielsweise: W. B. Jacoby and I. H. Pastan (eds.): Cell Culture, Methods in Enzymology (S. P. Colowick and N. D. Kaplan (eds.) Vol. LVIII, Academic Press, New York, 1979 sowie: Barnes, D. W., Sirbasku, D. A. and Sato, G. H.: Cell Culture Methods for Molecular and Cell Biology, Vol. 1-4, Liss, New York, 1984 sowie: Pflanzliche Zellkulturen und ihre Bedeutung für Forschung und Anwendung,

herausgegeben vom Bundesministerium für Forschung und Technologie, Bonn, o. J. — einschließlich der jeweils zitierten Literaturstellen.

Der größte Teil der in vitro kultivierbaren eukaryontischen Zellen, die sogenannten verankerungspflichtigen Zellen, benötigen sogenannte Zell- und Gewebekultursubstrate als Anhaftungs- und Wachstumsunterlage, siehe hierzu die oben genannte Literatur bzw. auch: Lindl, T. und Bauer, J.: Zell- und Gewebekultur, Fischer, Stuttgart (1987).

Derartige Zell- und Gewebekultursubstrate sind bekannt und als Roux bottles, Petrischalen, roller bottles, Microtiterplatten (Klonierungsplatten) und sogenannte "microcarrier beads" ausgebildet. Siehe hierzu beispielsweise die aktuellen Kataloge der Fa. Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, Fa. Greiner, Nürtingen oder Fa. Nunc, Wiesbaden.

Die Oberflächeneigenschaften, wie Oberflächenladung (sdichte), Hydratisierung und das Vorhandensein von funktionellen Gruppen, sind bei den als Zell- und Gewebekultursubstrate eingesetzten Materialien von besonderer Bedeutung und Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion und Forschung, siehe hierzu beispielsweise: Rauvala, H., Trends in Biochemistry Science, 7, 323—325 (1983) und Barngrover, Debra: "Substrata for Anchorage-dependent Cells" in Thilly, W. G. (ed.): Mammalian Cell Technology, Butterworths, Boston, London (1986), pp. 131—149 und die hierin zitierten Referenzen.

So muß das üblicherweise für Zell- und Gewebekultursubstrate eingesetzte Material Polystyrol beispielsweise durch Plasmabehandlung (Radiofrequenz-Zerstäubung) oder durch ionisierende Bestrahlung aktiviert werden, um in sogenannter TC-Qualität ("tissue culture" — Qualität) als Zell- und Gewebekultursubstrate eingesetzt werden zu können, siehe hierzu: Lee, H. B. et al.: Surface Characteristics of Tissue Culture Dishes and Corona Treated Polystyrene in: Transactions of the Society For Biomaterials, 13th Annual Meeting, p. 160 (1987).

Andere bekannte Verfahren, die Zelladhärenz und das Zellwachstum auf Oberflächen von Materialien, die als Zell- und Gewebekultursubstrate eingesetzt werden, zu fördern, ist die Beschichtung dieser Oberflächen mit Kollagen, Laminin, Lysin, Heparin und extrazellulärer Matrix (ECM), siehe hierzu ebenfalls: Barngrover Debra: "Substrata for Anchorage-dependent Cells" in Thilly, W. G. (ed.): Mammalian Cell Technology, Butterworths, Boston, London (1986), pp. 131—149 und die hierin zitierten Referenzen.

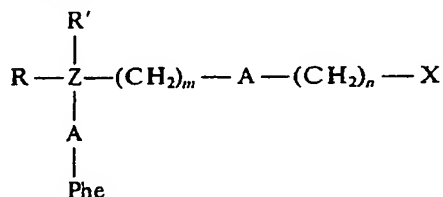
Aufgrund der Vielfalt der verschiedenen Zellarten und Zelltypen in vivo ist es auch ohne weiteres verständlich, daß sich bisher noch kein als Zell- und Gewebekultursubstrat eingesetztes Material bzw. eine Methode zur Behandlung dieser Materialoberfläche als überlegen erwiesen hat.

Die kommerziell reichlich erhältlichen plasmabehandelten Zell- und Gewebekultursubstrate eignen sich in der Regel nur zur Langzeitkultivierung sogenannter etablierter Zelllinien. Siehe hierzu beispielsweise: Neumeier, R.: "Zell-Substrat-Adhäsion und Wachstumskontrolle in vitro" in Maurer, H. R.: Zellkultur — Methoden, Arbeitsbuch des vom 7. bis 9. Oktober 1987 abgehaltenen Zellkulturkurses, Institut für Pharmazie der FU Berlin (1987), pp. 38 und 39.

Bei der Beschichtung von Substratoberflächen mit Fibronectin, Laminin, Heparin, ECM etc. ist von Nachteil, daß diese Substanzen aufgrund ihrer Molekülgröße bzw. ihrer Zusammensetzung (ECM) physikalisch-chemisch nicht eindeutig charakterisiert sind, eine starke Chargenvariabilität aufweisen und dadurch die Bedingungen der Zellkultivierung häufig nicht reproduzierbar sind.

Aufgabe der Erfindung ist es, an und für sich bekannte, aber für Zellkulturzwecke in dieser Form ungeeignete synthetische Materialien, bevorzugt solche, die aus mindestens einem aromatischen Monomeren synthetisiert worden sind oder arylderivatisierte makromolekulare Verbindungen, insbesondere wenn diese Materialien bzw. Verbindungen in Form von Folien, Kügelchen, Fasern, Roux bottles, Klonierungsplatten, roller bottles, Röhrchen oder anderen für Zell- und Gewebekulturzwecke geeigneten Ausbildungen vorliegen, als Zell- und Gewebekultursubstrate mit physikalisch-chemisch definierten Substratoberflächen in bekannter Art und Weise einsetzen zu können. Dies bedeutet wiederum, daß Ladungsträger und/oder zelladhärenzspezifische Kohlenhydrate unter Zellkulturbedingungen auf den Oberflächen dieser synthetischen Materialien bzw. makromolekularen Verbindungen fest verankert sein müssen.

Die Aufgabe wird, wie aus Anspruch 1 ersichtlich, dadurch gelöst, daß man als erfindungsgemäße Zell- und Gewebekultursubstrate synthetische Materialien oder arylderivatisierte makromolekulare Verbindungen einsetzt, an deren Oberflächen Verbindungen der allgemeinen Formel



wobei Z: P, N, S, O, Si oder C ist

wobei A: Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (—S—S—), Methylen (—CH—) oder —NH— sein kann;

wobei m und n gleich oder unterschiedlich sind und 0 bis 10, vorzugsweise 1 bis 5 sind;

wobei: Phe ein gegebenenfalls aryl-, alkyl-, alkenyl-, alkinyl-, carboxy-, carbamin-, halogen-, nitro-, hydroxi-, amino-, oxo-, acyl- oder cycloalkylsubstituierter aromatischer Rest;

wobei: R ein gegebenenfalls aryl-, carboxy-, carbamin-, halogen-, nitro-, hydroxi-, amino-, oxo-, acyl- oder cycloalkylsubstituierter Alkyl-, Alkenyl-, Alkinylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, Phe oder Wasserstoff ist;

wobei R': Sauerstoff, Schwefel, R oder unterschiedlich R ist;

wobei X: Wasserstoff, eine Sulfon-, Sulfat-, Phosphatgruppe, quaternäre Ammoniumgruppe, amid- oder glykosi-

disch gebundene Zuckergruppe, sulfat- oder phosphat-ester-gebundene aminierte, phosphorilierte oder acetylierte Zuckergruppe ist, adsorbiert ist bzw. sind.

Diese Zell- und Gewebekultursubstrate sind dadurch herstellbar, daß man synthetische Materialien, insbesondere wenn sie aus mindestens einem aromatischen Monomeren synthetisiert worden sind, oder arylderivatisierten makromolekularen Verbindungen, insbesondere wenn sie diese Materialien bzw. Verbindungen in Form von Folien, Kügelchen, Fasern, Roux bottles, Klonierungsplatten, roller bottles, Röhrchen oder anderen für Zell- und Gewebekulturzwecke geeigneten Ausbildungen vorliegen, mit einer Lösung, in der eine oder mehrere der mit der vorstehenden allgemeinen Formel beschriebenen aromatischen Verbindung bzw. Verbindungen gelöst ist bzw. sind, in innigen Kontakt bringt und anschließend das Lösungsmittel wieder vollständig entfernt.

Synthetische Materialien, die aus mindestens einem aromatischen Monomeren synthetisiert worden sind, und die in für Zell- und Gewebekultur geeigneten Ausbildungen vorliegen, sind beispielsweise als Polystyrol oder die Copolymerisate des Styrols, Polycarbonate, Polyalkylenterephthalate, Polyvinylcarbazol, Polyphenylenoxid, Polysulfon, Polyethersulfon, Polyarylimid, Polybenzimidazol, Polybenzoxacindion, Polyphenylen, Polyphenylen-sulfid, Poly-p-Xylylen, poly(p-Phenylen-) Terephthalamid etc. bekannt.

Arylderivatisierte makromolekulare Verbindungen, die aufgrund ihrer Ausbildung als Zell- und Gewebekultursubstrate einsetzbar sind, sind bekannt: beispielsweise tritylierte Agarosekügelchen ("beads") aus der US-PS 43 79 843 und dem Fachmann geläufig.

Im folgenden werden die Begriffe "makromolekulare Verbindungen" bzw. "arylderivatisierte makromolekulare Verbindungen" näher erläutert, da sie Grundlage der vielfältigen Ausgestaltungsmöglichkeiten dieser Erfindung sind.

Der Begriff makromolekulare Verbindung ist in: Elias, H.-G.: Mega Molecules, Springer, Berlin, Heidelberg, London (1987) eingehend dargestellt. Bevorzugt, aber ohne daß daraus eine Limitierung abzuleiten wäre, werden als makromolekulare Verbindungen eingesetzt: Verbindungen aus der Stoffklasse der Polysaccharide, wie Stärke, Amylopectin, Agar-Agar, Agarose, Dextran oder Cellulose (Sägestaub oder Baumwoll-Linters) oder aus der Stoffklasse der wasserlöslichen Kunststoffe, wie Polyvinylalkohol, Polyvinylether, Polyvinylester oder Acrylpolymerisate oder aus der Stoffklasse der Siliziumverbindungen, wie Glas, Quarzglas, Bentonit, Kieselgur, Blähton oder Siloxane.

All diese Verbindungen zeichnen sich zum einen dadurch aus, daß sie problemlos in einer Vielzahl von für Zell- und Gewebekulturzwecke geeigneten Ausbildungsformen — z. B. für Ionen und Proteine, permeable Folien oder Kügelchen mit einer um 1 g/cm^3 liegenden Dichte — leicht und preiswert erhältlich sind, zum anderen dadurch, daß sie durch Hydroxi-(Silanol-)-Gruppen repräsentierte funktionelle reaktive Gruppen aufweisen, die ihrerseits Voraussetzungen dafür sind, daß man diese Verbindungen in eine arylderivatisierte Form überführen kann, um sie als Ausgangsmaterial für die Herstellung der erfindungsgemäßen Zell- und Gewebekultursubstrate einsetzen zu können.

Diese Gruppen können in bekannter Art und Weise, siehe beispielsweise Greene, T. W.: Protecting Groups in Organic Chemistry, Wiley-Interscience, New York (1981) sowie die dort aufgeführten Zitate, mit reaktiven Arylverbindungen derart umgesetzt werden, daß das Umsetzungsprodukt aromatischen Charakter bekommt. Als nicht einschränkende Beispiele für reaktive Arylverbindungen, mit denen die funktionellen reaktiven Gruppen der makromolekularen Verbindungen umgesetzt sein können, seien genannt: Benzoessäureanhydrid, Benzoylchlorid, 3-Benzoyl-propionsäure, Benzylbromid, Benzylchlorid, Benzylchlorformiat, Bromtriphenylmethan, tert.-Butyldiphenylchlorsilan, 4-Chlorbenzylalkohol, 9-Chlor-9-phenylxanthen, Chlortriphenylmethan, 4,4'-Dimethoxytritylchlorid, 1,3-Dimethyl-1,1,3,3-tetra-phenyldisilazan, Dimethyltritylbromsilan, 2,4-Dinitro-benzolsulfenylchlorid, Diphenylmethylchlorsilan, 1,3-Diphenyl-1,1,3,3-tetramethyldisilazan, 4-Methoxy-benzylalkohol, 4-Methoxytrityl-chlorid, 1-Naphthylisocyanat, 2-Naphthylmercaptan, Neokupferon, 4-Nitro-benzoylchlorid, 4-Nitrophenyl-chlorformiat, Phenyl-chlorformiat, 2,2,2-Trichlorethyl-chlorformiat, 2-Triphenylphosphinoethyl-chlorformiatchlorid, Phenyltrimethylchlorsilan, Phenylisocyanat, Toluol-3,4-dithiol, Tosylchlorid, Toluol-4-sulfonamid, Tosylhydrazid, Trimethylsilyl-benzolsulfonat, Triphenylsilyl-benzolsulfonat, 2-Trimethylsilylethyl-p-nitrophenylcarbonat, Triphenylbrommethan, Triphenylchlormethan, Triphenylchlorsilan, Tripyridinium-tetrafluoroborat, Phenylisothiocyanat, Triphenylbromsilan, Benzylhalogenide, Phenylhalogenide und andere reaktive aromatische Verbindungen.

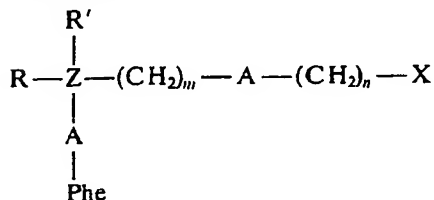
Bei der erfindungsgemäßen Herstellung der Zell- und Gewebekultursubstrate werden als arylderivatisierte makromolekulare Verbindungen bevorzugt phenylen-, phenyl-, benzal-, benzyl-, phenylsilyl-, benzalsilyl-, benzylsilyl-, triphenylmethyl-, triphenylsilyl-, diphenylmethyl- oder diphenylsilyl-derivatisierte Polysaccharide, wasserlösliche Kunststoffe oder Siliziumverbindungen eingesetzt.

Im folgenden werden nicht einschränkende Beispiele von bevorzugt für die Herstellung der Zell- und Gewebekultursubstrate einsetzbaren arylderivatisierten makromolekularen Verbindungen genannt: triphenyl-derivatisierte Cellulose (z. B. aus Triphenylbrommethan und Sägemehl) oder phenyl-derivatisierte Agarose (z. B. aus Phenylhydrazin und/oder Benzylchlorid und Agarosekügelchen ("Agarose-Beads")) oder diphenyl-derivatisierter Polyvinylalkohol (z. B. aus Diphenylmethylchlorsilan und Polyvinylalkohol) oder triphenyl-derivatisiertes Aluminiumhydroxid (z. B. aus Triphenylchlorsilan und Aluminiumhydroxid-Pulver) oder phenyldimethyl(silyl)-derivatisiertes Glas (beispielsweise als Umsetzungsprodukt von Phenyldimethylchlorsilan und/oder Diphenyldichlorsilan mit Glaskügelchen), phenyl(silyl)-derivatisierter Blähton (z. B. aus Phenyltrichlorsilan und gemahlenem Blähton) oder eine Folie aus poly(Dimethyl-Diphenyl)-Siloxan (erhalten durch Copolymerisation von polymerisierbarem Dimethylsiloxan und Diphenylsiloxan) sowie ähnliche durch Arylderivatisierung aromatisierbare makromolekulare Verbindungen in Zell- und Gewebekultursubstrat geeigneter Ausbildung.

Als Faustregel gilt, daß die Arylderivatisierung der makromolekularen Verbindungen so sein muß, daß die arylderivatisierten Verbindungen hydrophober, also mit Wasser schlechter benetzbar sein müssen, als die nicht arylderivatisierten Polysaccharide, wasserlöslichen Kunststoffe oder Siliziumverbindungen, wenn diese arylderiv-

vatisierten makromolekularen Verbindungen zur erfindungsgemäßen Herstellung der Zell- und Gewebekultursubstrate eingesetzt werden sollen.

Zur erfindungsgemäßen Herstellung der Zell- und Gewebekultursubstrate werden die oben näher beschriebenen synthetischen Materialien oder die arylderivatisierten makromolekularen Verbindungen mit einer Lösung, in der eine oder mehrere aromatische Verbindungen der allgemeinen Formel



wobei Z: P, N, S, O, Si oder C ist;

wobei A: Schwefel, Sauerstoff, Disulfid ($-\text{S}-\text{S}-$), Methylen ($-\text{CH}-$) oder $-\text{NH}-$ sein kann;

wobei m und n gleich oder unterschiedlich sind und 0 bis 10, vorzugsweise 1 bis 5 sind;

wobei: Phe ein gegebenenfalls aryl-, alkyl-, alkenyl-, alkinyl-, carboxy-, carbamin-, halogen-, nitro-, hydroxi-, amino-, -oxo-, acyl- oder cycloalkylsubstituierter aromatischer Rest;

wobei: R ein gegebenenfalls aryl-, carboxy-, carbamin-, halogen-, nitro-, hydroxi-, amino-, oxo-, acyl- oder cycloalkylsubstituierter Alkyl-, Alkenyl-, Alkinylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, Phe oder Wasserstoff ist;

wobei R': Sauerstoff, Schwefel, R oder unterschiedlich R ist,

wobei X: Wasserstoff, eine Sulfon-, Sulfat-, Phosphatgruppe, quaternäre Ammoniumgruppe, amid- oder glykosidisch gebundene Zuckergruppe, sulfat- oder phosphatester-gebundene aminierte, phosporilierte oder acetylierte Zuckergruppe ist,

gelöst sind, in innigen Kontakt gebracht und anschließend das Lösungsmittel wieder vollständig entfernt.

Bevorzugt werden Phenyl-, Phenoxy-, Thiophenyl-, (Phenthio-), Benzal-, Benzyl-, Phenylsilyl-, Benzalsilyl-, Benzylsilyl-, Diphenylmethyl-, Diphenylsilyl-, Triphenyl-, Triphenylmethyl- oder Triphenylsilylverbindungen gemäß obenstehender allgemeiner Formel in Lösung gebracht.

Die Auswahl der Verbindungen richtet sich danach, welche Art Ausgangsmaterial verwendet wird: bei der Verwendung von o. g. synthetischen Materialien bzw. bei diphenyl-, diphenylsilyl-, triphenylmethyl- oder triphenylsilylderivatisierten makromolekularen Verbindungen werden Phenyl-, Phenoxy-, Benzal-, Benzyl-, Phenylsilyl-, Benzalsilyl-, Benzylsilyl-, Diphenylmethyl-, Diphenylsilyl-, Triphenyl-, Triphenylmethyl- oder Triphenylsilylverbindungen gemäß o. g. Formel in einem geeigneten Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch gelöst eingesetzt. Wenn man hingegen phenyl-, benzal-, benzyl-, phenylsilyl-, benzalsilyl- oder benzylsilylderivatisierte makromolekulare Verbindungen als Ausgangsmaterialien verwendet, werden Lösungen eingesetzt, in denen Phenyl-, Phenoxy-, Benzal-, Benzyl-, Phenylsilyl-, Benzalsilyl-, Benzylsilylverbindungen gelöst sind.

Im folgenden sind nicht limitierende Beispiele für Phenyl-, Phenoxy-, Thiophenyl-, Benzal-, Benzyl-, Phenylsilyl-, Benzalsilyl- oder Benzylsilylverbindungen angeführt, die Bestandteil der Lösungen sind, mit denen die synthetischen Materialien bzw. arylderivatisierten makromolekularen Verbindungen in innigen Kontakt gebracht werden: Phenol, Anilin, 2-Phenyl-ethylalkohol, 1-Phenyl-ethylamin, 2-Phenylethylamin, Phenylethylenglykol, 1-Phenyl-ethanol, 2-Anilino-ethanol, 2-Phenylethanthiol, Phenylalanin; Tryptophan, Phenylbernsteinsäure, Benzoesäure, Biphenyl-4-methanol, Phenylborsäure, Phenyl-brenztraubensäure, 4-Phenyl-buttersäure, N-Phenylharnstoff, 4-Phenyl-2-butylamin, 4-Aminophenylessigsäure, Aminophenol, N-Phenyl-diethanolamin, Phenylglycinol, Phenylglyoxylsäure, Phenylhydrazin(hydrochlorid), Phenylharnstoff, O-Phenyl-hydroxylamin-hydrochlorid, Phenylmalonsäure, Thiophenol, Phenylmercaptoessigsäure, Amino-diphenylether, 3-Amino-2,3-dihydrobenzoesäure-hydrochlorid, 4-Phenyl-cyclohexanon, N-Phenyl-diethanolamin, Phenyl-dichlorphosphat, Phenyl-dichlorphosphin, Phenyl-dimethylchlorsilan, Phenylessigsäure, Phenylessigsäurechlorid, Phenyl-formamid, Phenyl-methansulfonylchlorid, Phenylmilchsäure, Phenylphosphinsäure, Phenylphosphonsäure, Phenyl-dichlorphosphat, 1-2-Phenoxy-glycin, 2-Phenoxy-alanin, 2-Phenoxy-essigsäure, 2-Phenoxy-essigsäureamid, Phenylpiperazin, 4-Benzylpiperidin, Phenylpropanolamin, Phenylpropionsäure, 2-Phenyl-propionaldehyd, Phenyl-propylalkohol, Phenyl-propylamin, Phenyl-propylbromid, Phenidon, Phenylsalicylat, 1-Phenyl-semicarbazid, Phenyl-dimethylsilanol, Phenyl-dimethylsilylamin, Schwefelsäure-phenylester, Phosphorsäure-phenylester, Kresole, Nitrophenole, Aminophenole, Phenyltrimethylammoniumchlorid, Brenzcatechin, Resorcin, Pyrimidine, 2-Phenoxy-ethanol, 4-Amino-diphenylether, 3-Phenoxy-benzaldehyd, 4-Phenoxy-buttersäure, 4-Phenoxy-phenol, 3-Phenoxytoluol, Phenylacetaldehyd, 2,2-Dimethoxyethylenbenzol, Hydrochinon, Pyrogallol, Phloroglucin, Eugenol, Isoeugenol, Anethol, Vanillin, Thymol, Saccharin, aromatische Sulfonsäuren, Benzosulfonsäure, Phthalimid oder ähnliche Verbindungen, sowie die Umsetzungsprodukte von Benzoesäureanhydrid, Benzoylchlorid, 3-Benzoylpropionsäure, Benzylbromid, Benzylchlorid, Benzyl-chlorformiat, 4-Chlor-benzylalkohol, 9-Chlor-9-phenylxanthin, 1,3-Dimethyl-1,1,3,3-tetra-phenyldisilazan, 2,4-Dinitrobenzolsulfonylchlorid, Diphenylmethylchlorsilan, 1,3-Diphenyl-1,1,3,3-tetramethyldisilazan, 4-Methoxy-benzylalkohol, 1-Naphthylisocyanat, 2-Naphthylmercaptan, Nokupferron, 4-Nitro-benzoylchlorid, 4-Nitrophenyl-chlorformiat, Phenylchlorformiat, 2,2,2-Trichlorethylchlorformiat, Phenyl-dimethylchlorsilan, Phenylisocyanat, Toluol-3,4-dithiol, Tosylchlorid, Toluol-4-sulfonamid, Tosylhydrazid, Trimethylsilyl-benzolsulfonat, 2-Trimethylsilylethyl-p-nitrophenylcarbonat, Phenylisothiocyanat, Triphenylbromsilan, Benzylhalogenide, Phenylhalogenide und anderen reaktiven aromatischen Verbindungen mit aminierte, phosporilierte und/oder acetylierte Zuckern oder Peptiden oder Proteinen.

Im folgenden sind nicht limitierende Beispiele für Diphenylmethyl- oder Diphenylsilylverbindungen angeführt,

die Bestandteil der Lösungen sind, mit denen die synthetischen Materialien bzw. arylderivatisierten makromolekularen Verbindungen in innigen Kontakt gebracht werden: Schwefelsäure-diphenylsilanester, Phosphorsäure-diphenylsilanester, Diphenyldiaminsilan, Diphenyldialkoxysilan, Diphenyldihydroxysilan, O-(Diphenylsilyl)dihydroxylamin, Diphenylsilyldimethoxysulfat, Diphenylsilyl-diethanol, Diphenylsilyldipropylamin oder ähnliche Verbindungen, sowie die Umsetzungsprodukte von tert.-Butyldiphenylchlorsilan, Diphenylmethylchlorsilan, 1,3-Diphenyl-1,1,3,3-tetramethyldisilazan, 1-Naphthylisocyanat, 2-Naphthylmercaptan und anderen reaktiven aromatischen Verbindungen mit aminierten, phosphorilierten und/oder acetylierten Zuckern, oder Peptiden oder Proteinen.

Im folgenden sind nicht limitierende Beispiele für Triphenyl-, Triphenylmethyl- oder Triphenylsilylverbindungen angeführt, die Bestandteil der Lösungen sind, mit denen die synthetischen Materialien bzw. arylderivatisierten makromolekularen Verbindungen in innigen Kontakt gebracht werden: Triphenylamin, Triphenylphosphat, Triphenylphosphinoxid, Triphenylphosphinsulfid, Triphenylphenylphosphin-dibromid, Triphenylzinnchlorid, O-Tritylhydroxylamin, Triphenylmethan, Triphenylmethanol, Triphenylmethanthiol, Triphenylsilan, Triphenylsilanol, Triphenylsilylamin, O-Triphenylsilylhydroxylamin, Triphenylsilylphosphat, N-Triphenylsilyl-glucosamin, O-(Triphenylsilyl)-ethoxylamin, O-(Triphenylsilyl)-propyl- β -galactopyranosid, O-Triphenylsilyl-glucosamin, O-Triphenylsilyl-neuraminsäure, Triphenylsilyl- β -D,L-galactopyranosid, Triphenylsilyl- β -D,L-glucopyranosid, Triphenyl- β -D,L-mannopyranosid, Triphenylsilylsulfat, (Na-, K- oder Li-Salz), Ester zwischen aminierten, phosphorilierten und/oder acetylierten Zuckern mit Triphenylsilylsulfat oder -phosphat, Etherverbindungen aus Triphenylchlorsilan oder Triphenylbromsilan und phosphorilierten, aminierten und/oder acetylierten Zuckern, Triphenylsilylethylamin, Triphenylsilyl-essigsäure, Triphenylsilyl-buttersäureamid, Triphenylsilyl-glycerin, Triphenylsilyl-ethylenglykol, Triphenylsilylpolypropylenglykol, Triphenyl-silylsilanol, Triphenylsilylpropylsulfat (Na-, K- oder Li-Salz) oder ähnliche Triphenylsilylverbindungen, sowie die Umsetzungsprodukte von Bromtriphenylmethan, Chlortriphenylmethan, 4,4'-Dimethoxytritylchlorid, Dimethyltritylbromsilan, 4-Methoxytritylchlorid, Neokupferron, 2-Triphenylphosphinoethyl-chlorformiatchlorid, Triphenylsilyl-benzolsulfonat, Triphenylbrommethan, Triphenylchlormethan, Triphenylchlorsilan, Tripyridiniumtetrafluoroborat, Triphenylbromsilan und anderen reaktiven aromatischen Verbindungen mit aminierten, phosphorilierten und/oder acetylierten Zuckern oder Peptiden oder Proteinen.

Das Lösen derartiger Verbindungen, die alle der allgemeinen Formel gemäß Anspruch 1 gehorchen, speziell der bevorzugten Phenyl-, Phenoxy-, Thiophenyl-, (Phenthio-) Benzal-, Benzyl-, Phenylsilyl-, Benzalsilyl-, Benzylsilyl-, Diphenylmethyl-, Diphenylsilyl-, Triphenyl-, Triphenylmethyl- oder Triphenylsilylverbindungen in einem Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch stellt kein Problem dar und ist bekannt. Für Triphenyl-, Triphenylmethyl-, Triphenylsilyl- oder evtl. auch Diphenyl(silyl-)verbindungen kommen unpolare Lösungsmittel wie Chloroform, Hexan, Methylenchlorid und Petrolether in Frage. Diphenyl- oder Phenylverbindungen werden in hydrophilen organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Butanol, Isopropanol und Aceton gelöst, ebenso wie in Mischungen aus diesen Flüssigkeiten. Erforderlich können auch wässrige Lösungsmittel verwendet werden, bzw. Bestandteil eines zur Lösung der eingesetzten aromatischen Verbindungen benötigten Lösungsmittelgemisches sein. Insgesamt unterliegt die Auswahl der Lösungsmittel dabei drei Gesichtspunkten: erstens dürfen sie das eingesetzte Ausgangsmaterial nicht zersetzen, wie es beispielsweise der Fall wäre, wenn man Materialien aus Polystyrol mit einer Triphenylsilylphosphatlösung in Aceton in innigen Kontakt brächte, zweitens müssen sie für die eingesetzten Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel gute Lösungsmittel sein und drittens sollten die Lösungsmittel mit geringem Energieaufwand leicht wieder zu entfernen sein, d. h. ihr Siedepunkt muß niedrig, vorzugsweise unter 120°C liegen. Die Kriterien sind aber durch gezieltes experimentelles Ausprobieren leicht zu erfüllen.

Das in-innigen-Kontakt-Bringen der synthetischen Materialien bzw. der arylderivatisierten makromolekularen Verbindungen mit der Lösung, in der die aromatischen Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel von Anspruch 1 gelöst sind, stellt, ebenso wie das vollständige Entfernen des Lösungsmittel(gemisches) kein Problem dar: so suspendiert man partikelförmige Ausgangsmaterialien, z. B. (Polystyrol-) Kugeln ("beads"), in der die eingesetzten Verbindungen enthaltenden Lösung und entfernt das Lösungsmittel(gemisch) mit Hilfe eines Rotationsverdampfers wieder vollständig.

Flächige Ausgangsmaterialien, z. B. Folien oder Petrischalen werden mit der die eingesetzten aromatischen Verbindungen enthaltenden Lösung besprüht, wobei man das Lösungsmittel(gemisch) dann verdunsten läßt. Weiterhin können flächige Ausgangsmaterialien durch einfaches Eintauchen in die Lösung und anschließendes Herausziehen hergestellt werden. Ebenfalls ist es möglich, die Ausgangsmaterialien in den jeweiligen eingesetzten Lösungen bis zu ihrer Verwendung aufzubewahren. Von Vorteil kann es sein, nach der makroskopischen Entfernung des Lösungsmittels die nunmehr oberflächenmodifizierten Materialien für ca. 10 Minuten auf Temperaturen zwischen 60 und 100°C, je nach verwendetem Ausgangsmaterial zu bringen.

Gegebenenfalls werden die Materialien, die mit den eingesetzten Lösungen in innigen Kontakt gebracht worden sind, kurz vor ihrem unmittelbaren Einsatz als Zell- und Gewebekultursubstrat mit wässriger Lösung gewaschen, um sie von überschüssigem Adsorbat, das ist (sind) die Verbindung(en), die in der eingesetzten Lösung gelöst ist (sind), zu befreien. Die Wahl der Methode des in-innigen-Kontakt-Bringens der Ausgangsmaterialien mit der eingesetzten Lösung ist ebenso wie die vollständige Entfernung des Lösungsmittels bzw. Lösungsmittelgemisches problemlos experimentell optimierbar.

Beim Entfernen des Lösungsmittel(gemisches) kommt es, zumindest initial, — aufgrund hydrophober und van der Waal'scher Kräfte — zu einer stabilen Adsorption der in dem Lösungsmittel(gemisch) befindlichen, aromatischen Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel von Anspruch 1, an die synthetischen, aus mindestens einem aromatischen Monomeren synthetisierten Materialien oder die arylderivatisierten makromolekularen Verbindungen. (Theoretisch besteht die Möglichkeit, daß sich diese initial adsorptive, hydrophobe Bindung im weiteren Verlauf zu einer echten kovalenten Bindung entwickelt, was vor allem unter Bedingungen, wo das Mittel

eingesetzt wird, der Fall sein kann. Aus dieser Möglichkeit soll aber auf keinen Fall eine Einschränkung der Erfindung konstruiert werden können, wenn von anderer Seite gezeigt werden kann, daß es sich um keine reinadsorptive Bindung o. g. aromatischer Verbindungen an die synthetischen Materialien oder an die aryliderivatisierten makromolekularen Verbindungen handelt, da die gestellte Aufgabe auf jeden Fall gelöst wurde).

Es versteht sich, daß die mengenmäßige Zusammensetzung der einzelnen eingesetzten, in einem Lösungsmittel(gemisch) gelösten aromatischen Verbindungen gemäß Anspruch 1, für jede zu kultivierende Zelllinie jeweils experimentell ermittelt werden muß, was dem Fachmann bei der Vielfalt der potentiell kultivierbaren eu- und auch prokaryontischen Zellen verständlich ist. Da die eingesetzten aromatischen Verbindungen bekannt und physikalisch-chemisch gut charakterisiert sind, ist auch dies nicht schwierig.

Die Kosten dieser Zell- und Gewebekultursubstrate sind gering. Eine große Anzahl an unterschiedlichen Materialtypen, Kunststoffe mit Benzolringen in der Molekülkette oder durch einfache chemische Modifikation aromatisierte Naturstoffe, stehen zur Verfügung. Die eingesetzten aromatischen Verbindungen, die an diese Materialien adsorbiert werden, sind hinsichtlich Ladung und Molekülstruktur bekannt. Durch Auswählen der Ausgangsmaterialien und der aromatischen Verbindungen, auf Basis von "trial and error", kann für nahezu jeden Zelltyp, jede Zelllinie die Oberfläche der Zell- und Gewebekultursubstrate leicht "maßgeschneidert" werden.

Beispiele

Synthetische Materialien

1. Als Ausgangsmaterial wird eine aus Polystyrol bestehende "Makroplatte für die Bakteriologie" mit sechs 35 mm im Durchmesser messenden Vertiefungen (Fa. Greiner, Nürtingen) verwendet. In diese Vertiefungen werden je 3 ml folgender Lösungen eingefüllt:

- a) 2-Propanol (Fa. Fluka, Ulm) = Kontrolle
- b) 0,001 % Phenylalanin in Wasser/2-Propanol (1 : 1, v/v)
- c) 0,001 % Triphenylsilylsulfat in 2-Propanol
- d) 0,001 % Triphenylmethanthiol in 2-Propanol
- e) 0,0001 % Phenyl- β -D-galactopyranosid in Wasser
- f) eine Mischung in gleichen Teilen der Lösungen b) bis e).

Die jeweiligen Lösungsmittel werden durch Verdunstenlassen bei Raumtemperatur bzw. gegebenenfalls mit Hilfe eines Föns vollständig aus den Näpfen entfernt. Nach UV-Sterilisation kann dann diese bakteriologische Makroplatte in üblicher Weise als Zell- und Gewebekulturplatte eingesetzt werden.

2. Als synthetisches Ausgangsmaterial werden Divinyl-benzolvernetzte Polystyrolkugeln (XAD-4 bzw. XAD-2 der Firma Fluka, Ulm, bzw. Biobeads SX-2 der Fa. BioRad, München) verwendet. Jeweils 3 g dieser Kügelchen werden in 30 ml der folgenden Lösungen, in einem Rotationsverdampfer-Rundkolben, suspendiert:

- a) gesättigte Phenylalaninlösung in Wasser/Aceton (100 : 1 v/v)
- b) gesättigte Triphenylsilylsulfatlösung in Aceton
- c) gesättigte Triphenylmethanollösung in 2-Propanol
- d) gesättigte 2-Phenoxy-glycinlösung in Wasser/Aceton (75 : 25 v/v)
- e) 0,01 % Phenyl- β -Glucopyranosidlösung in Wasser/Aceton (100 : 1 v/v)
- f) Mischung aus gleichen Volumina von a), b) und c).

Die Lösungsmittel(gemische) werden in einem Rotationsverdampfer bei 70°C und ca. 350 mbar Unterdruck bis zur völligen Trockenheit der Kügelchen entfernt. Die Kügelchen werden anschließend durch Waschen in Ringerlösung von überschüssigem Adsorbat befreit, im feuchten Zustand UV-sterilisiert und als "microcarrier" in bekannter Art und Weise eingesetzt.

3. Verwendung von poly(p-Phenylen-)Terephthalamid (Kevlar (R)) als synthetisches Ausgangsmaterial. Kevlar(R)-Fasern (Fa. DuPont, Düsseldorf) werden in folgenden Lösungen bis zum bestimmungsgemäßen Einsatz gelagert (Lagerungszeit Stunden bis Wochen):

- a) gesättigte 2-Phenoxy-alaninlösung in Wasser/Aceton (90 : 10 v/v)
- b) gesättigte Phenyltrimethylsilylsulfatlösung in Aceton
- c) gesättigte Phenylalaninlösung in Wasser
- d) gesättigte Thiophenollösung in 5%iger wässrige Galactoselösung
- e) gesättigte Benzaldehydlösung in Wasser
- f) Mischung aus gleichen Volumina von a), c), d) und e).

Zur Verwendung als Zell- und Gewebekultursubstrat wird das Material aus den jeweiligen Lösungen genommen, um überschüssiges Adsorbat zu entfernen, kurz in Wasser getaucht, anschließend UV-sterilisiert und in bekannter Art und Weise eingesetzt.

4. Verwendung von Polyethylenterephthalat (Mylar(R)) als synthetisches Ausgangsmaterial:

Mylar (R)-Folien (Fa. DuPont, Düsseldorf) werden mit folgenden Lösungen besprüht.

- a) gesättigte Phenylalaninlösung in Wasser
- b) gesättigte p-Toluylaldehydlösung in Wasser/Aceton (90 : 10 v/v)
- 5 c) gesättigte 2-Phenylethylaminlösung in Wasser
- d) gesättigte 2-Amino-benzoesäurelösung in Wasser.

Nach vollständigem Trocknen werden die Folien bestimmungsgemäß eingesetzt.

- 10 5. Verwendung von Polycarbonat (Makrofol (R)):
Makrofol (R)-Folie (Fa. Bayer, Leverkusen) wird mit den Lösungen 3a), 3c), 3e), 3d), 4b) und 4d) besprüht und nach dem Trocknen, d. h. Verdunsten der Lösungsmittel eingesetzt.

- 15 6. Verwendung eines Copolymerisats aus Diphenyl- und Dimethylsiloxan (in Form einer sogenannten weichen Kontaktlinse) als synthetisches Ausgangsmaterial:
Die Kontaktlinse (Fa. Bausch & Lomb, Rochester, USA) wird in folgenden Lösungen bis zu ihrer Verwendung als Zell- und Gewebekultursubstrat aufbewahrt (mehrere Stunden bis Tage):

- a) gesättigte Lösung von di-Natriumphosphat in Wasser
- 20 b) gesättigte Lösung von Phenyl- β -glucopyranosid in Wasser
- c) Mischung aus gleichen Volumina von a) und b).

Überschüssiges Adsorbat wird kurz vor Einsatz durch Eintauchen in Wasser entfernt, das Material im feuchten Zustand UV-sterilisiert.

25

Arylderivatisierte makromolekulare Verbindungen

7. Verwendung von diphenylsilylierten Glaskügelchen als Ausgangsmaterial:
Verwendet werden Glaskügelchen der Fa. Serva, Heidelberg, durchschnittlicher Durchmesser 125 bis 180 μ m. Die Diphenylsilylierung der Glasoberfläche erfolgt mit Diphenyldichlorsilan in Tetrachlorkohlenstoff (je 1 Gramm Kügelchen mit jeweils 10 ml einer 5%igen Diphenyldichlorsilanlösung in Tetrachlorkohlenstoff, Reaktion unter ständigem Rühren bei 37°C über 24 Stunden, Abfiltration der Glaskügelchen, Waschen in Hexan, anschließend in Aceton und danach in Wasser).

- 35 3 g der arylderivatisierten Glaskügelchen werden in 30 ml der folgenden Lösungen, in einem Rotationsverdampfer-Rundkolben, gegeben:

- a) gesättigte Phenylalaninlösung in Wasser
- b) gesättigte Triphenylsilylaminlösung in 2-Propanol
- c) gesättigte Triphenylsilylsulfatlösung in Aceton
- 40 d) gesättigte di-Natriumphosphatlösung in Wasser
- e) gesättigte Benzoesäurelösung in 8%iger wässriger Glucoselösung
- f) gesättigte di-Natriumphosphatlösung in 8%iger wässriger Sorbitlösung
- g) gesättigte Phenylmilchsäurelösung in Wasser
- h) Mischung aus gleichen Volumina von a), b), d) bis g).

45

Entfernung der Lösungsmittel und weiteres Procedere wie unter 2. beschrieben.

8. Verwendung von tritylierter Baumwolle:
Baumwolle (Baumwoll-Linters, Fa. Fluke, Ulm) wird gemäß der US-PS 43 79 843 mit der Modifikation trityliert, daß die Tritylierungsreaktion über 72 Stunden erfolgt und das Produkt mit Chloroform, danach Aceton gewaschen wird und im feuchten Zustand (jeweils 1 g) in folgenden Lösungen suspendiert wird:

- a) gesättigte Phenylalaninlösung in Wasser
- b) gesättigte di-Natriumphosphatlösung in Wasser
- 55 c) gesättigte Triphenylsilylaminlösung in 2-Propanol
- e) gesättigte Benzosulfonsäurelösung in Wasser
- f) gesättigte Benzyltrimethylammoniumchloridlösung in Wasser
- g) Mischung aus gleichen Volumina von e) und f).

- 60 Verwendung wie unter 2. beschrieben.

9. Verwendung einer phenylsilylderivatisierten Dialysiermembran aus Cellulose:
Eine Dialysiermembran aus Cellulose (Fa. Medicell International, London) wird mit Phenyltrichlorsilan phenylsilylderivatisiert (ca. 3 m Dialysiermembran in 250 ml einer 2%igen Phenyltrichlorsilanlösung in Tetrachlorkohlenstoff, Reaktionsdauer ca. 2 Stunden, weiteres Procedere wie unter 7. beschrieben. (Anstelle von Phenyltrichlorsilan läßt sich auch Phenyldimethylchlorsilan problemlos einsetzen).

65

Kurz vor dem Einsatz als Zell- und Gewebekultursubstrat wird die arylderivatisierte Dialysiermembran für mehrere Minuten in folgenden Lösungen getaucht und danach gleich bestimmungsgemäß eingesetzt:

- a) gesättigte Phenylalaninlösung in Wasser
- b) gesättigte Benzolsulfonsäurelösung in Wasser
- c) gesättigte Phenyl- β -galactopyranosidlösung in Wasser
- d) 2%ige Benzoesäurelösung in wässriger 2% Glucose-6-Phosphat enthaltender Lösung (Alter dieser Lösung: mehrere Tage)
- e) gesättigte Thiophenollösung in Wasser.

5

Diese Membran eignet sich besonders für die Kultivierung von polaren, zum transzellulären Stoffwechseltransport befähigten Zellen.

10

10. Verwendung von Polyvinylalkohol 49 000 (Fa. Fluka, Ulm):
 10 ml einer 10%igen wässrigen Polyvinylalkohollösung werden mit einer 10 ml Spritze, die ihrerseits mit einer 2er Nadel versehen ist, in 30 ml einer 2%igen Lösung von Phenyltrimethylchlorsilan in Tetrachlorkohlenstoff gespritzt, Reaktionszeit ca. 120 Minuten, ständiges Rühren, Raumtemperatur, die ausgefallenen sphärischen Partikel werden abfiltriert und, wie unter 2. beschrieben, weiter verarbeitet. Jeweils eine Aliquot dieser phenyltrimethylsilylderivatisierten, nun nicht mehr wasserlöslichen "beads" wird in die gemäß 2. bis 9. angeführten Phenyl-, Phenoxy-, Benzol-, Thiophenylverbindungen enthaltenden Lösungen gegeben.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -